

BEST AVAILABLE COPY

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

平3-215499

⑫ Int. Cl.

C 07 K 15/22
A 61 K 31/765
31/785
37/14
C 07 K 17/08
C 08 L 25/04

識別記号

ABZ
LEJ

序内整理番号

8619-4H
7431-4C
7431-4C
8615-4C
8619-4H
8416-4J

⑬ 公開 平成3年(1991)9月20日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全3頁)

⑭ 発明の名称 ヘモグロビン複合体

⑮ 特願 平2-8497

⑯ 出願 平2(1990)1月19日

⑰ 発明者 松山 賢治 長崎県西彼杵郡長与町三根郷53-127 合同宿舎長与住宅
⑱ 発明者 市川 正孝 長崎県長崎市白鳥町10-2-401
⑲ 発明者 小田 安治 長崎県長崎市花園町20-8-201
⑳ 出願人 株式会社ミドリ十字 大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号
㉑ 代理人 弁理士 佐々木 清隆 外3名

明細書

1. 発明の名称

ヘモグロビン複合体

2. 特許請求の範囲

ヘモグロビンとスチレン無水マレイン酸共重合体とを結合させた複合体。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、人工血液用の酸素運搬体として有用なヘモグロビンとスチレン無水マレイン酸共重合体とを結合せしめた複合体に関するものである。

(従来の技術・発明が解決しようとする課題)

外科手術に於ける輸血の占める重要性は高く、手術の成功、不成功の鍵を握っている現状である。

しかし、今日、輸血をめぐる数々の問題が深刻化しており特にその供給面の問題、さらにA1D1Sウィルス、non-A、non-Bウィルス混入の問題も深刻で人工血液の開発はこれらの諸問題を解決する点からも極めて意義が大きい。

ところで、人工血液の開発はこれまでにも種々

の試みがなされている。この様な状況下、ヘモグロビンを用いて赤血球の代用にしようという研究も数多くなされている。

ヘモグロビンは脊椎動物の赤血球の主要部分を構成する、鉄分子を含む錯蛋白質化合物である。血液の代わりにヘモグロビン溶液を使用することは、血液型についての問題も解決される。ヘモグロビンは血液(動物又は人)から分離することが出来また血液よりも更に長時間貯蔵のために凍結乾燥することが出来る。

しかし、ヘモグロビンは腎臓から速やかに尿中に排泄される。従って往々ヘモグロビン溶液を多量に輸注しなければならず、排泄の速度が高いことに加え、腎臓の病気を有する患者に対しては潜在的な危険性が高いと言う難点を有する。

この問題を解決するためにヘモグロビンをグルタルアルデヒドで相互結合させたもの(特公昭62-16932号公報)、ヘモグロビンをデキストラン(特公昭60-21124号公報)若しくはヒドロキシエチル澱粉(西独公開2616086号)に結合せしめたも

の、ポリアルキレングリコールに結合せしめたもの（特公昭60-23084号公報）等が提案された。しかしながら、これらのものは酸素運搬能力あるいは抗原性の点で必ずしも満足する結果は得られていない。

一方、ヘモグロビンのリボソーム化（特開昭61-37735号公報）、マイクロカプセル化（特開昭56-152424号公報）なども試みられてはいるが、細胞内系による貯食という問題等からも実用化が困難な現状にある。

以上のことから明白なように、従来技術の欠点を解消するためには、血管内滞留時間が長く（換言すればクリアランスの低いヘモグロビン）、ヘモグロビンと同程度の酸素運搬能力を有し、人体蓄積性がなく、無害である性質を有する人工血液用酸素運搬剤が要求されている。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者らは、かかる問題点を解決するために、種々検討を重ね、ヒト血清アルブミンと強いタンパク結合性を有するスチレン無水マレイン酸共重

ール-硫酸、例えばピリドキサール-5'-硫酸、グリセリンリン酸類、例えばグリセリン-2,3-ジリン酸、糖リン酸、例えば、グルコース-6-リン酸、アデノシン-5'-リン酸等のヘモグロビン誘導体であってもよい。

ヘモグロビンのアンカーとして利用するスチレン無水マレイン酸共重合体は、分子量100～3000程度、スチレンと無水マレイン酸の構成比がスチレン対無水マレイン酸で40:60～80:20程度と例示される。

具体的には、分子量1600、50%スチレンのもの（コスモバイオ総合カタログ、No.6、pp665、品番3106参照）等が挙げられる。

ヘモグロビン-スチレン無水マレイン酸共重合体複合体の調製方法としては、ヘモグロビン1モルに対しスチレン-無水マレイン酸共重合体1～10モル程度を常法に従いアミド反応により結合させる。すなわち、ヘモグロビンのNH₂とスチレン無水マレイン酸共重合体のCOOHを反応させるわけである。

合体をヘモグロビンと結合させることにより該スチレン無水マレイン酸共重合体をヘモグロビンのアンカー（锚）として機能させることにより、ヘモグロビンの腎からの糸球体通過を防ぐもので、人工血液用酸素運搬体として満足しうる結果が得られることを見出した。

本発明は、上記の知見に基づいて完成されたものであり、その要旨は、ヘモグロビンとスチレン無水マレイン酸共重合体とを結合させたヘモグロビン複合体に関するものである。

本発明に使用するヘモグロビンは、ヒト、ウシ、ヒツジ、ウマ、イス、サル、ウサギ、ニワトリ等ヘモグロビンを有する動物由来のものであればよいが、好ましくは、ヒトヘモグロビンがよい。本明細書でいうヘモグロビンとは、いわゆる異常ヘモグロビン（K. Imai, Allsteric Effects in Haemoglobin, Cambridge University Press, 1980参照）あるいはピリドキサール-リン酸例えは、ピリドキサール-5'-リン酸、2-ノル-2-ホルミルピリドキサール-5'-リン酸、ピリドキサ

こうして調製されたヘモグロビン-スチレン無水マレイン酸共重合体複合体の性状としては、分子量5万～10万、結合比：ヘモグロビン対スチレン無水マレイン酸共重合体=1対1～10（分子比）、また、本発明においては、スチレン無水マレイン酸共重合体をアンカーとして、ヘモグロビンとアルブミンを結合させた複合体もその範疇に含む。

本発明に使用されるアルブミンは、血漿由來のアルブミンに限らず、細胞培養により、又組換え遺伝子工学的手法により得られるアルブミンでもよい。抗原性の問題からヒト由来のアルブミンであることが好ましく、それらは医療用に精製されたものであれば特に制限はない。その純度は、電気泳動で分析して80%以上がアルブミンであるものが好ましい。ヒト由来アルブミンを得る方法としては、エタノール分画法（特公昭47-2869、特公昭35-5297）、有機酸の存在下で加熱方法（特公昭43-1604、特公昭51-40132）等が例示される。特に好ましくは

特開平3-215499 (3)

アルブミンを加熱処理（好ましくは、60℃、10時間程度）して肝炎ウイルス等不活化処理を行ったものが使用される。

これらの複合体は、当該患者に対し、薬学的に許容し得る賦形剤、希釈剤または担体と混合して、例えば水性溶液（等張緩衝塩溶液であってもよい）として投与してもよい。一般にこれら複合体は血漿増量剤の投与について慣用的に用いられる様々なタイプの製剤、包装、および投与形態を用いて投与されることになる。これら複合体はまた、場合により寒冷保護剤と共に凍結乾燥し、後で使用のために再生してもよい。

複合体の投与量は、患者の体重、症状あるいは希望の処置に応じて変わることになる。しかしながら、重篤な場合には実質的にすべての患者の血液を本発明の複合体を含有する組成物により置換してもよい。

【発明の効果】

本発明により得られる複合体は、血管内滞留時間が長く、ヘモグロビンと同程度の酸素運搬能力

を有し、人体蓄積性がなく、無害であり、しかも生体内でヒト血清アルブミン（HSA）と強く蛋白結合するため、腎におけるHbの糸球体通過が防止され、長時間生体内に滞留することが可能となる等の性質を有し、人工血液の酸素運搬体として、例えば、事故や暴力の犠牲者に対し、血液型および適合性を調べることが不可能あるいは与えられた時間内で不可能な場合に、患者が通常の輸血では危険またはそれを拒否する場合に、保存すべき組織および器官に酸素を供与する目的で、体外循環系をプライミングするために、あるいは赤血球が通常使用されるその他の状態に用いることができ、医療産業上または臨床においても新たな発展を可能にするものである。

【実施例】

本発明をより詳細に説明するために、実施例および実験例を挙げるが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

実施例

ヒトヘモグロビン 100mgを0.2M重炭酸ナトリウ

ム水溶液(pH8)10mlに4℃で攪拌させながら溶解させた。溶解後、この溶液にスチレン無水マレイン酸共重合体(50%スチレン、分子量 1600、コスモバイオ総合カタログ、No.6、pp665、品番 3106 参照)100mgを添加し、1.5時間反応させた。得られた反応液をセファデックス(Sephadex®)G-50(ファルマシア社製)で処理してゲル通過した。蒸留水を溶出液とし、溶出液を280nmの吸光度で検出し、目的画分を分取し、凍結乾燥してヘモグロビン複合体を得た。

この複合体は分子量約8万ヘモグロビン1分子にスチレン無水マレイン酸共重合体が平均で2分子結合していた。

代理人弁理士(8107)佐々木清隆
(ほか3名)

